

学校编码: 10384
学号: 32720131150558

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

慢性乙型肝炎病毒感染者的长期自然转归
特征研究

Characterization of long-term natural outcome of chronic
hepatitis B virus infections

杨 林

指导教师姓名: 张 军 教 授

袁 权 副 教 授

专 业 名 称: 流行病与卫生统计学

论文提交日期: 2016 年 05 月

论文答辩时间: 2016 年 05 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 月

慢性乙型肝炎病毒感染者的长期自然转归特征研究

杨林

指导教师

张军
教授

袁权

副教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

目录

摘要	I
Abstract	III
第一章 前言	1
1 乙型肝炎病毒	1
1.1 嗜肝 DNA 病毒科.....	1
1.2 HBV 病毒结构.....	1
1.3 HBV 的生命周期.....	5
2 乙型肝炎感染	7
2.1 HBV 全球流行分布情况.....	7
2.2 HBV 传播方式.....	8
2.3 HBV 的感染类型.....	8
2.4 慢性 HBV 的感染造成的肝脏疾病和转归	10
3 乙型肝炎病毒基因型	13
3.1 HBV 基因型.....	13
3.2 HBV 基因型的临床意义.....	14
3.2 HBV 基因型检测方法	15
4 HBV 感染标志物	16
4.1 HBsAg 定量方法及临床意义	16
4.2 HBeAg 检测方法及临床意义	17
4.3 Anti-HBc 定量方法的发展及临床意义.....	18
5 本论文的研究目的、意义和思路	20
第二章 材料与方法	22

1 研究队列	22
2 研究中用到的主要仪器	23
3 分子及细胞生物学实验用常规试剂	24
3.1 分子克隆中用到的菌株和质粒	24
3.2 PCR 扩增及分子克隆用试剂	25
3.3 质粒及样品核酸提取试剂	25
4 诊断用免疫及核酸检测试剂	25
5 实验用溶液及培养基配制	25
5.1 常规分子生物学实验溶液的配制	25
5.2 病毒抗原/分子检测用溶液的配制	26
6 常规免疫实验操作	26
7 Realtime PCR 及基因序列测定	27
8 血清 Anti-HBc 水平的定量	28
8.1 双抗原夹心法 Anti-HBc 检测平台	28
8.2 Anti-HBc 定量标准品	28
8.3 Anti-HBc 水平的定量方法	29
9 常规分子生物学实验方法	30
9.1 PCR 扩增反应	30
9.2 DNA 片段的回收	30
9.3 连接反应	31
9.4 连接产物的转化	31
9.5 挑菌	31
10 生物信息学及统计学分析	32
第三章 结果与分析	33

1 研究队列基本特征	33
1.1 研究队列基线临床特征.....	33
1.2 基线 HBeAg 不同状态标本的特点	34
1.3 基线各参数的相关性	35
1.4 基线不同基因型的临床特点	36
2 慢乙肝的长期自然转归	36
2.1 自然过程中 HBeAg 阴转及其相关因素.....	36
2.2 自然过程中 HBsAg 阴转及其影响因素.....	39
3 HBsAg 水平的自然变化及其相关因素	44
4 不同自然转归感染者准种序列研究	47
5 慢乙肝感染者自然过程中肝癌发生情况	49
6 低剂量乙肝疫苗对 HBV 自然史的影响	50
第四章 讨论	54
1. 慢乙肝感染者 HBsAg 的自然阴转及其相关因素	54
2. 慢乙肝感染者自然历史过程中 HBsAg 的长期变化.....	55
3. 慢乙肝感染者 HBeAg 的自然阴转及相关因素	55
4. 慢乙肝感染者长期恶性转归.....	56
5. 乙肝疫苗与成人感染.....	57
第五章 小结与展望	59
参考文献	61
致谢	77
在校期间的科研成果	78

Content

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Preface	1
1 Hepatitis B virus	1
1.1 Hepadnaviridae	1
1.2 Genome of HBV	1
1.3 Life cycle of HBV	5
2 Hepatitis B virus infection	7
2.1 Global prevalence of HBV infection	7
2.2 Transmission of HBV	8
2.3 Infection type of HBV	8
2.4 chronic HBV infection causes liver disease and prognosis	10
3 Genotypes of Hepatitis B virus	13
3.1 Genotypes of HBV	13
3.2 Clinical significance of HBV genotypes	14
3.3 Detection of HBV genotypes	15
4 HBV infection markers	16
4.1 HBsAg quantitative methods and clinical significance	16
4.2 HBeAg quantitative methods and clinical significance	17
4.3 Development and Clinical Significance of Anti-HBc	18
5 Purpose and significance of the study	20
Chapter 2 Materials and methods	22

1. Clinical cohorts	22
2. Instruments.....	23
3. Reagents for routine molecular and cell biology experiments.....	24
3.1 Strains and plasmids	24
3.2 Reagents for PCR and cloning.....	25
3.3 Reagents for plasmids and nucleic acid extraction	25
4. Clinical diagnosis assays	25
5. Solvents and medium.....	25
5.1 Solutions for molecular biology experiments.....	25
5.2 Solutions for virus detection.....	26
6. Methods for routine immunodetection.....	26
7.Realtime PCR and Gene Sequencing.....	27
8. Quantification of serum anti-HBc level.....	28
8.1 Double-sandwich immunoassay for anti-HBc.....	28
8.2 Quantification standardization.....	28
8.3 Determination of anti-HBc level	29
9 methods of conventional molecular biology experimental.....	30
9.1 Polymerase Chain Reaction.....	30
9.2 DNA recovery.....	30
9.3 The ligation reaction	31
9.4 Transformation	31
9.5 Pick bacteria.....	31
10 Bioinformatic and statistical analyses	32
Chapter 3 Results and analysis	33

1.Basic characteristics of cohort.....	33
1.1 Basic characteristics of Clinical cohort	33
1.2 Characteristics of samples with different baseline HBeAg.....	34
1.3 Relevance of Baseline parameters	35
1.4 Baseline clinical characteristics in different genotypes	36
2. Natural outcome of chronic HBV infection.....	36
2.1 Natural processes HBeAg loss and its related factors	36
2.2 Natural processes HBsAg loss and its related factors	39
3 Natural changes in the level of HBsAg and its related factors	44
4 Quasispecies in different natural outcome	47
5 Liver cancer in Chronic hepatitis B infection	49
6 Effect of low doses of hepatitis B vaccine on the natural history of HBV	50
Chapter 4 Discussion.....	54
1. HBsAg serconversion aond factors in Chronic hepatitis B infection	54
2. HBsAg long-term changes in Chronic hepatitis B infection.....	55
3. HBeAg seroconversion and factors in Chronic hepatitis B infection	55
4. Malignant prognosis in Chronic hepatitis B infection	56
5. Hepatitis B vaccine and Adult infection.....	57
Chapter 5 Summary and prospect.....	59
References.....	61
Acknowledgement.....	77
Publications	78

摘要

慢性乙型肝炎病毒感染是世界重要的公共卫生问题，可以导致肝癌、肝硬化等终末期肝病，继而导致死亡。我国是慢乙肝高流行区，全国约有 1.2 亿的慢性 HBV 携带者，慢性乙肝患者约 3000 万例，HBV 感染对我国国民健康造成严重威胁。本研究的主要目的在于研究自然人群慢乙肝感染者的长期转归及其相关因素，监测乙肝相关肝硬化和肝癌的发病率，并且研究成人接种乙肝疫苗对其新感染的保护以及终末期肝病发生的影响。有助于更加深入的了解和认识乙肝，并为预防和预测乙肝相关终末期肝病提供重要的数据和依据。

本研究利用本实验室前期研发的戊型肝炎疫苗的三期临床试验，在江苏省东台市建立了一个自然人群的随访监测研究队列。其中我们对 446 例慢乙肝感染者随访 7 年，51 例 HBeAg 阳性感染者中有 23 例出现 HBeAg 自然阴转，基线 HBsAg 定量水平是其独立相关因素。7 年随访过程中 64 例慢乙肝感染者出现 HBsAg 自发阴转，年平均 HBsAg 阴转率为 2.04%。多因素 Logistic 回归分析发现基线 HBsAg 定量 [OR=0.424(0.322-0.559), $P<0.001$] 和 Anti-HBc 定量水平 [OR=1.750(1.208-2.536), $P=0.003$] 是与 HBsAg 阴转独立相关的两个指标。HBsAg 阴转率随基线 HBsAg 水平的下降而上升，当基线 HBsAg 在同一水平时，Anti-HBc 水平越高时，HBsAg 自然阴转率越高。HBsAg 定量水平在长期自然过程中呈现逐渐下降的趋势，平均每年下降 0.156 log₁₀ IU/ml。基线年龄 (OR=1.027, 95%CI: 1.001-1.053, $p=0.042$)，HBsAg (OR=0.591, 95%CI: 0.485-0.720, $p<0.001$) 和 Anti-HBc (OR=1.606, 95%CI: 1.215-2.123, $p=0.001$) 水平与 HBsAg 水平下降超过 1 Log₁₀ IU/mL 独立相关。我们监测了该地区 HBV 慢性感染者 6 年肝癌累计发病率 3.05%，年平均肝癌发病率 5.1%。与未发生肝癌的 HBV 感染者相比，发生肝癌的患者的年龄更大 (50.9 vs 49.2, $p=0.023$)，男性所占的比例会更高 (80% vs 45%, $p=0.007$)，HBeAg 阳性的患者更多 (60% vs 12.8%, $p<0.001$)，并且 HBV DNA 的水平更高 (4.5 vs 2.2 Log₁₀ IU/mL, $p<0.001$)。

另外，我们对参加戊肝三期临床试验人群接种戊肝疫苗组 56302 人，接种 5 μ g 乙肝疫苗组 56302 人进行了 4 年的肝癌、肝硬化主动监测，戊肝疫苗组共有 106 人发生肝癌，16 人发生肝硬化，肝癌和肝硬化的总累计发生率为 0.217%。

在乙肝疫苗组共有 107 人发生肝癌，有 12 人发生肝硬化，肝癌和肝硬化的总发生率为 0.210%。戊肝疫苗组和乙肝疫苗组肝脏终末期肝病无显著性差异 ($p=0.796$)。筛选出基线 Anti-HBc 阴性并且第 5 年有随访到的人群，其中接种戊肝疫苗 1545 人，接种乙肝疫苗 1686 人。4 年的随访中，戊肝疫苗组 Anti-HBc 的累积阳转人数为 97 人，163 人，186 人和 226 人，4 年累积阳转率为 14.6%；而在乙肝疫苗组累积阳转人数分别为 104 人，156 人，198 人和 250 人，4 年累积的阳转率为 14.8%，两组没有显著差异 ($p=0.9$)。

综上所述，本研究揭示了 HBV 慢性感染者自然过程中的长期转归及其相关因素，并研究了成人乙肝疫苗对其自然史的影响。为深入了解慢乙肝，对慢乙肝的防控提供了重要依据。

关键词：乙型肝炎病毒，慢性乙型肝炎感染，乙型肝炎病毒表面抗原阴转，乙肝自然史，基因型，E 抗原血清学转换

Abstract

Chronic HBV infection is a major public health problem in the world which can lead to liver cancer, cirrhosis, end-stage liver diseases, and death in the end. China is a HBV high prevalence area with about 120 million chronic HBV carriers and 30 million cases of chronic hepatitis B patients. HBV infection is a serious threat to our public health. The main purpose of this study is to investigate the long-term outcome of natural population of chronic hepatitis B infection and its related factors, monitor the incidence of hepatitis B related cirrhosis and liver cancer, and study the impact of hepatitis B vaccine for adult on their new infection protection and end-stage liver disease. The investigation contributes to a deeper understanding and awareness of hepatitis B and provides important data basis on hepatitis prevention and prediction of related end-stage liver disease.

In this study, we used a preliminary research, a Hepatitis E virus vaccine Phase III clinical trial of our lab, set up a natural population monitoring study visits queue in Dongtai, Jiangsu Province. Sera were obtained from 446 chronic hepatitis B virus patients followed up for 7 years. 23 of 51 HBeAg positive patients turned to natural HBeAg seroconversion. Baseline HBsAg quantitative levels were the independent related factors. During the 7-year-follow-up, 64 chronic hepatitis B virus carriers turned to natural HBsAg seroconversion with annual average rate of 2.04%. Multivariate Logistic regression analysis showed that baseline quantitative HBsAg [OR = 0.424 (0.322-0.559), $P < 0.001$] and anti-HBc quantitative level [OR = 1.750 (1.208-2.536), $P = 0.003$] were two independently indicators associated with HBsAg seroconversion. The rate of HBsAg loss rise with baseline HBsAg levels decreased. When at the same baseline HBsAg, The rate of HBsAg loss rise with anti-HBc levels rise. Quantitative HBsAg levels showed a gradual downward trend in long-term natural process with average 0.156 log₁₀ IU / ml per year. Baseline age (OR = 1.027, 95% CI: 1.001-1.053, $p = 0.042$), HBsAg (OR = 0.591, 95% CI: 0.485-0.720, $p < 0.001$) and Anti-

HBc (OR = 1.606, 95% CI : 1.215-2.123, $p = 0.001$) levels were independently associated with HBsAg levels decreased by more than 1 Log₁₀ IU / ml. We monitored six year liver cancer cumulative incidence of chronic HBV carriers of that area was 3.05%, the average annual incidence 5.1 %. Compared with the HBV infection without liver cancer, the patients of HCC were older (50.9 vs 49.2, $p = 0.023$). The proportion of men is higher (80% vs 45%, $p = 0.007$), with more HBeAg positive patients (60% vs 12.8%, $p < 0.001$), and higher levels of HBV DNA (4.5 vs 2.2 Log₁₀ IU / mL, $p < 0.001$).

In addition, we monitored 56302 people participated in the Hepatitis E virus Phase III clinical trial who were given Hepatitis E vaccine and 56302 people who were given 5 μ g Hepatitis B vaccine for 4-year active surveillance of liver cancer and cirrhosis. 106 liver cancer and 16 cirrhosis were in the group of hepatitis E vaccine with the total cumulative incidence of 0.217%. 107 liver cancer and 12 cirrhosis were in the group of hepatitis B vaccine with the total cumulative incidence of 0.210%. End-stage liver diseases of hepatitis E vaccine group had no significant difference ($p = 0.796$) between that of hepatitis B vaccine group. We selected a group with baseline negative Anti-HBc and kept a 5-year follow-up. Among them, 1545 people inoculated hepatitis E vaccine, 1686 people of hepatitis B vaccine. During the 4 years follow-up, there are 97, 163, 186 and 226 people cumulatively with positive anti-HBc in hepatitis E vaccine group. The 4-year cumulative seroconversion rate was 14.6%. In the group of hepatitis B vaccine group cumulative seroconversion were respectively 104, 156, 198 and 250, with 4-year cumulative seroconversion rate of 14.8%. The two groups showed no significant difference ($p = 0.9$).

In conclusion, this study revealed the natural long-term outcome of chronic HBV infection and the related factors. And we also investigated the effects of hepatitis B vaccine to adults' natural history. This study provides an important basis for better understanding chronic hepatitis B and chronic hepatitis B prevention.

Key words: Hepatitis B virus, chronic hepatitis B virus infection, Hepatitis B surface antigen loss, hepatitis B natural history, genotype, Hepatitis B e antigen seroconversion

第一章 前言

1 乙型肝炎病毒

1.1 嗜肝 DNA 病毒科

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus），简称乙肝病毒（下简称 HBV）。HBV 是嗜肝病毒科（Hepadnavirus）的原型成员之一，按照不同感染的宿主来区分可以分为正嗜肝 DNA 病毒属（Orthohepadnavirus）和禽嗜肝 DNA 病毒属（Avihepadnavirus）。正嗜肝 DNA 病毒属主要的宿主为哺乳动物，包括乙型肝炎病毒（HBV）、地松鼠肝炎病毒（Ground Squirrel Hepatitis Virus, GSHV）、土拨鼠肝炎病毒（Woodchuck Hepatitis Virus, WHV）和绒毛猴肝炎病毒（Woolly Monkey Hepatitis Virus, WMHV）等；禽嗜肝 DNA 病毒属主要包括鹤乙肝病毒（Crane Hepatitis B Virus, CHBV）、雁乙肝病毒（Sheldgoose Hepatitis B Virus, SHBV）、鸭乙肝病毒（Duck Hepatitis B Virus, DHBV）、鸛乙肝病毒（Stork Hepatitis B Virus）等^[1-5]，下面主要就人乙肝病毒进行介绍。

1.2 HBV 病毒结构

HBV 最早是在澳大利亚土著人的血液中发现的，发现者为 Blumberg 等人，最早被称为“澳大利亚抗原”^[6,7]。后来发现 HBV 在复制的过程中可以形成以下三种不同的颗粒（如图 1 所示），且其在结构和组成上各不相同，有各自的特点：

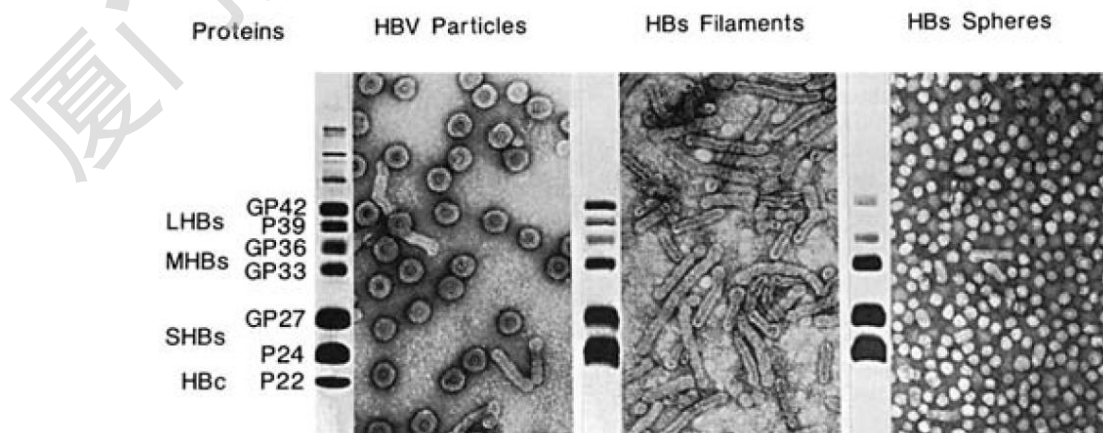


图 1 HBV 三种病毒颗粒的形态^[8]

Fig.1 Morphology composition of purified HBV particles^[8]

1.2.1 乙肝病毒颗粒

a) 大球形颗粒：为完整的 DNA 病毒颗粒，具有感染性，最早由 Dane 等人描述，故也称为 Dane 颗粒，由一个囊膜以及一个含有 DNA 分子的核衣壳所组成，直径约为 42-47nm，核壳是一个 20 面体的对称结构^[9, 10]。Dane 颗粒主要包括双层脂膜和乙肝病毒表面抗原（hepatitis B surface antigen, HBsAg），表面抗原又可分为大抗原（L-HBsAg）、中抗原（M-HBsAg）和主抗原（S-HBsAg），其比例约为 1:1:4^[11]。在外膜内为直径约 27nm 的正 20 面体的核心抗原。另外在感染的 HBV 细胞中还会向外分泌 e 抗原（Hepatitis B e Antigen, HBeAg）。各种抗原的形态如下（图 2）：

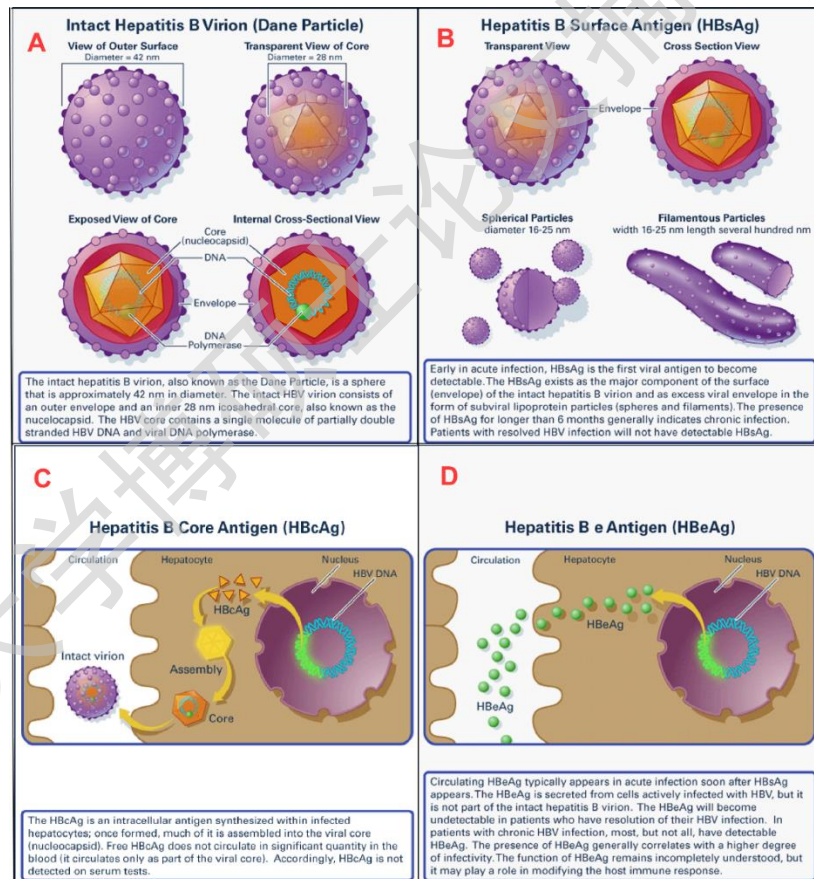


图 2 Dane 颗粒示意图^[12]

Fig.2 A.Dane particle. ^[12]

b). 小球形颗粒（HBs Spheres）：不具有感染性且没有核酸的病毒颗粒，为血清中含量最高的亚病毒颗粒，数量约为大球形颗粒的 1000-10000 倍^[13]。它是在病毒入侵细胞后，细胞过量生成的表面抗原然后分泌到血清中形成的。小球形

颗粒的成分主要是 S-HBsAg 和脂膜, 另外有少量的颗粒中含有 M-HBsAg。Gilbert RJ 等人通过研究转基因鼠体内的小球形颗粒, 发现其是存在两种构象的特殊的八角体结构 (图 3) [12]

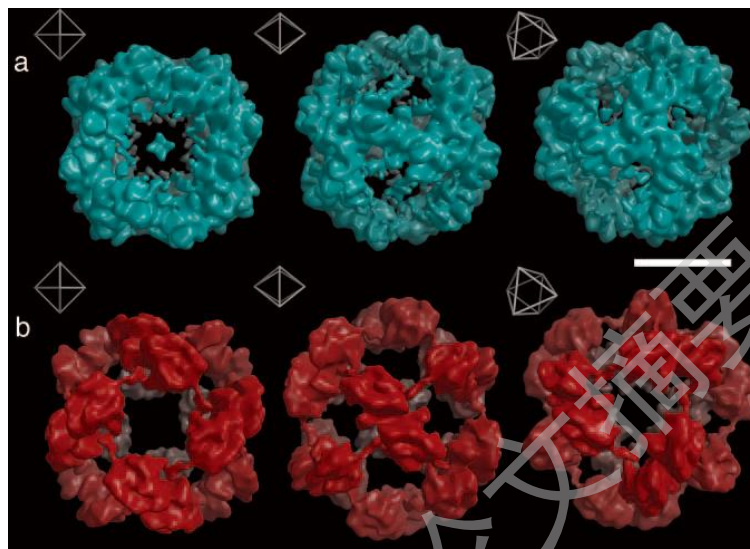


图 3 小球形的 3D 结构示意图^[12]

Fig.3 Three dimensions reconstruction of spherical sub-viral particle.^[12]

c).管形颗粒 (HBs Filaments): 血清中的第三种 HBV 颗粒, 数量大约为大球形颗粒的 10-20 倍, 主要成分为表面抗原和脂膜, 同样没有核酸, 不具有感染性。表面抗原包括 L-HBsAg、M-HBsAg、S-HBsAg 三种形式, 比例与 Dane 颗粒相似, 大约为 1:1:4^[14]。Short, J.M. 等人通过研究发现管状颗粒主要有其亚单位组成的类似尖峰的结构, 从包膜往外突出形成的管状结构^[15], 如图 4

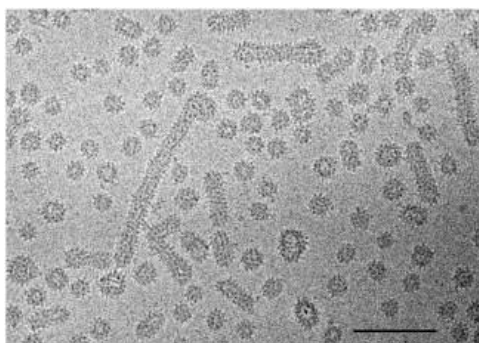


图 4 管状颗粒电镜结构图^[15]

Fig.4 Electron microscopic structure of HBs Filaments^[15]

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.